

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss auf die Proliferation

Psoriasis vulgaris ist eine genetisch bedingte, schubweise verlaufende, entzündliche Dermatose. Pathogenetisch liegt eine Verhornungsstörung mit überstürzter Zellproliferation und fehlerhafter Ausdifferenzierung vor. Auf der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten für hyperproliferative Hauterkrankungen wie die Psoriasis und Tumoren wurden die antiproliferativ wirkenden glucosidierten Phospholipidanaloga Glc-PAF und Glc-PC synthetisiert. Für Untersuchungen zum Einfluss der Analoga auf die Proliferation und weitere Zellfunktionen wird die immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCaT als Hautmodell verwendet.

Als eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung beider Substanzen erweist sich die Verwendung von serumfreiem Medium in den Proliferationstests. In Anwesenheit von fetalem Kälberserum kann auch in hohen Konzentrationen bis zu 60 μ M nur ein geringer Einfluss auf die Proliferation festgestellt werden (Abb.7).

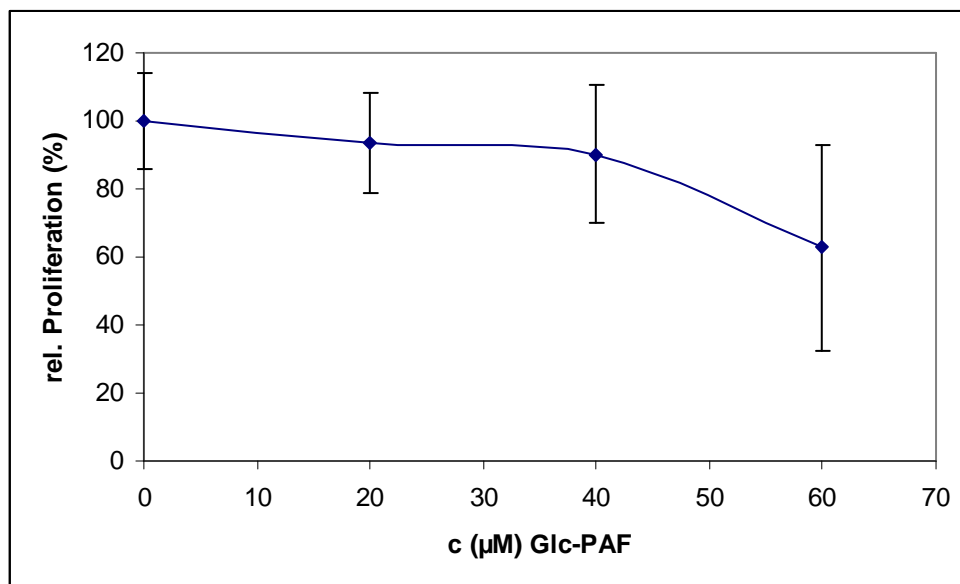


Abb. 7: Proliferation von HaCaT-Zellen in Anwesenheit von fetalem Kälberserum (FCS) nach 48h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 20 μ M bis 60 μ M. Es werden drei unabhängige Achtfach- Bestimmungen durchgeführt. Für diese Abbildung sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen angegeben.

Anschließend Proliferationstests werden immer standardisiert in serumfreiem Keratinocytenmedium (KGM+) durchgeführt. Glc-PAF wird dabei in Konzentrationen von 1,25 μ M bis 10 μ M eingesetzt. Die Proliferation der HaCaT-Zellen wird durch Glc-PAF konzentrationsabhängig gehemmt. Die IC₅₀ dieser Substanz liegt dabei angenähert bei 3,0 μ M (Abb.8).

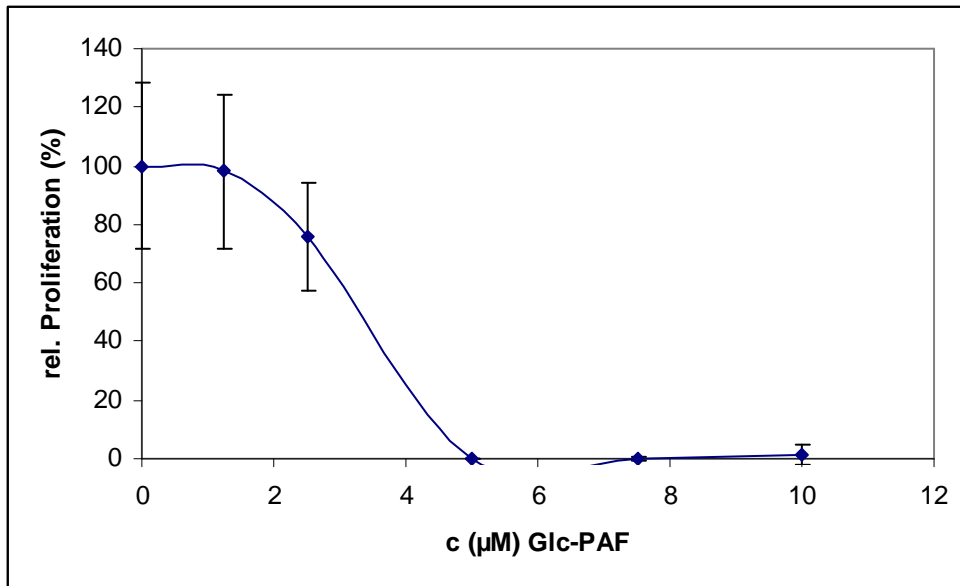


Abb. 8: Proliferation in serumfreiem Keratinocytenmedium nach 48h Inkubation mit Glc-PAF. Es werden vier unabhängige Achtfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

Glc-PC ist erst bei höheren Konzentrationen ähnlich wirkungsvoll wie Glc-PAF. und wird in einem Konzentrationsbereich von 2,5µM bis 20µM eingesetzt. Die IC_{50} liegt für diese Substanz bei 8,7µM. (Abb.9).

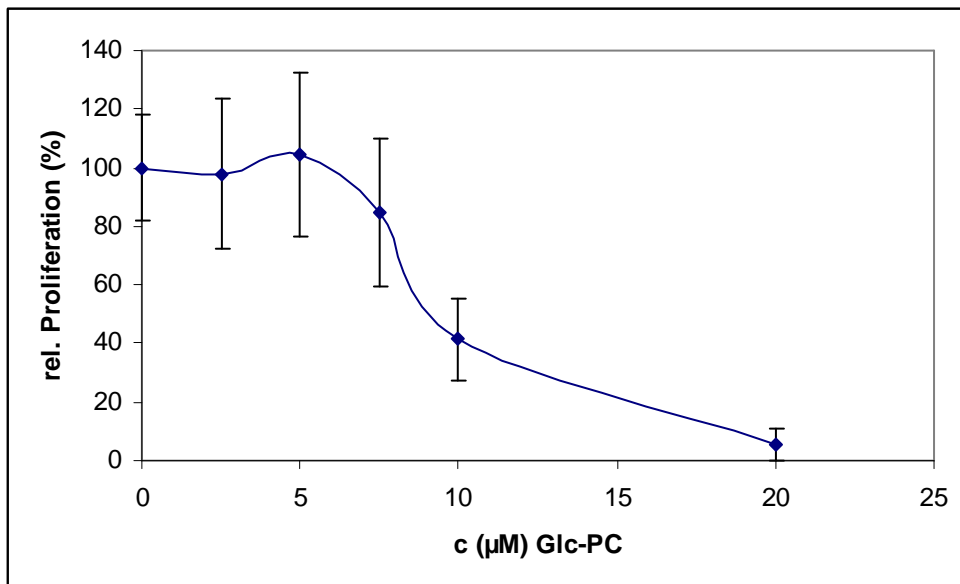


Abb. 9: Proliferation von HaCaT- Zellen nach 48h Inkubation mit Glc-PC. Es werden fünf unabhängige Achtfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

Außer auf HaCaT-Zellen, bei denen es sich um eine nicht-tumorigene, immortalisierte, humane Keratinozytenzelllinie handelt, wird die proliferationshemmende Wirkung der glucosidierten Phospholipidanaloga auch auf einer Zelllinie mit autonomer Wachstumsregulation nachgewiesen. Bei SCC-25-Zellen (Squamous cell carcinoma) handelt es sich um Zellen, die von einem Zungenbodenkarzinom abstammen.

Wie bei HaCaT-Zellen, kann auch in diesem Zellsystem eine konzentrationsabhängige Hemmung auf das Zellwachstum durch die glucosidierten Phospholipidanaloga nachgewiesen werden. Die Wirkung ist hier noch effektiver als in HaCaT-Zellen. $1,25\mu\text{M}$ Glc-PAF senken die Proliferation in SCC-Zellen auf unter 10%. Die IC_{50} liegt bei annähernd $0,6\mu\text{M}$ (Abb.10)

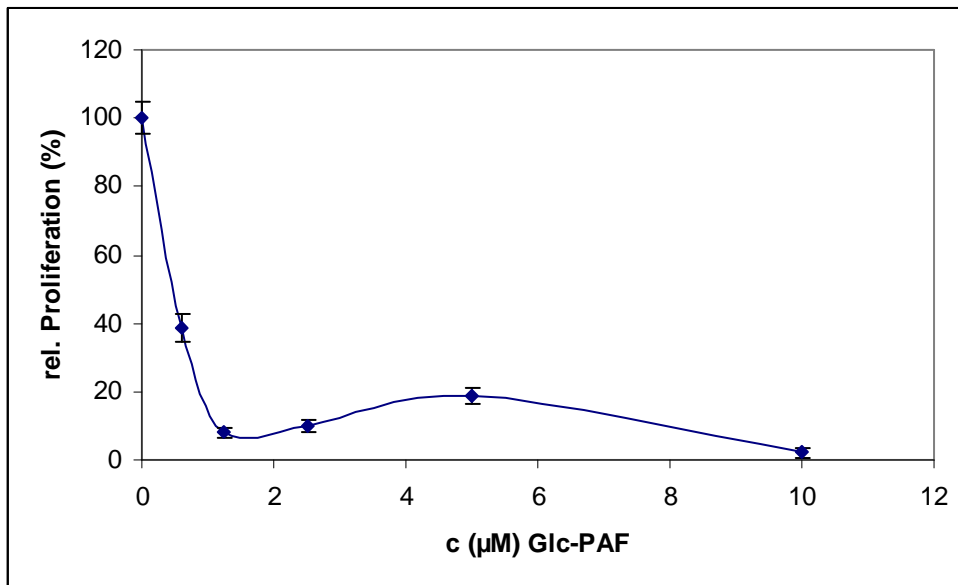


Abb. 10: Proliferation von SCC- Zellen nach 48h Inkubation mit Glc-PAF. Es werden drei unabhängige Achtfach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

Diese Tendenz ist auch bei Glc-PC zu beobachten. Während 7,5 μM Glc-PC die Proliferation in HaCaT-Zellen um 16% senken, werden SCC Zellen mit der gleichen Konzentration um mehr als 60% in ihrem Wachstum gehemmt (Abb.11).

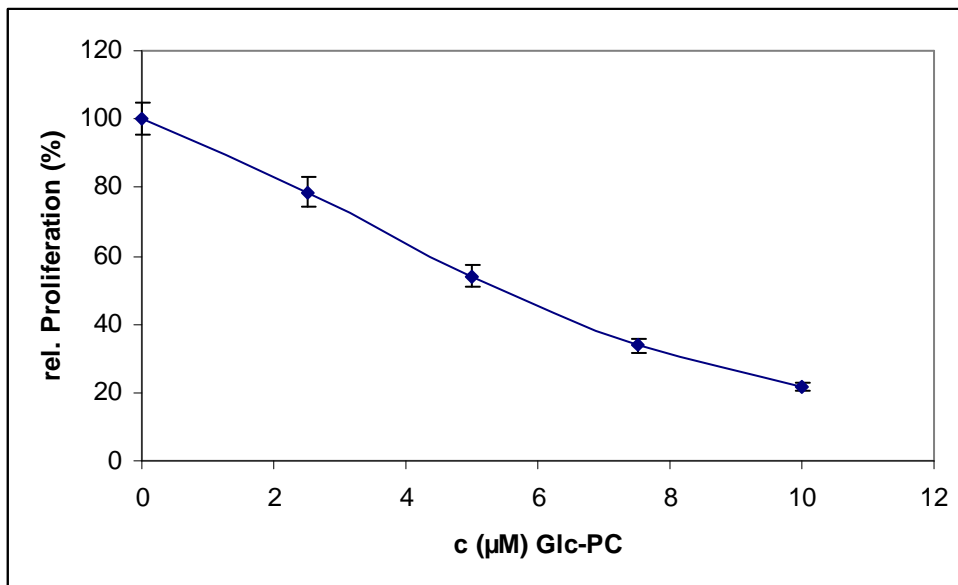


Abb. 11: Proliferation mit SCC-Zellen nach 48h Inkubation mit Glc-PC. Es werden drei unabhängige Achtfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.2. Bestimmung der Zytotoxizität

Glucosidierte Phospholipidanaloga wirken in höheren Konzentrationen zytotoxisch, da sie durch ihren amphiphilen Charakter in die Membran interkalieren und deren Integrität zerstören. Um die eigentliche antiproliferative Wirkung vom nekrotischen Absterben der Zellen abgrenzen zu können, muß die Zytotoxizität der Substanzen in geeigneten Assays bestimmt werden.

3.2.1. Trypanblaumethode

Es werden zwei verschiedenen Methoden angewandt. Zunächst die Methode der Trypanblaufärbung. Das Trypanblau kann nur von Zellen mit geschädigter Zellmembran aufgenommen werden und diese anfärben. Intakte Zellen können diesen Farbstoff nicht aufnehmen. Bei einer Inkubationszeit von 2 h sowie 48 h ist bis zu einer Konzentration von 10 μM Glc-PC keine erhöhte Toxizität zu beobachten. Die Viabilität, als Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzahl, ist im Vergleich zu Kontrolle nicht verändert.

Auch nach Inkubation der Zellen mit Glc-PAF bis max. 5 μM kann keine Veränderung der Membranintegrität festgestellt werden (Abb. 12 und 13).

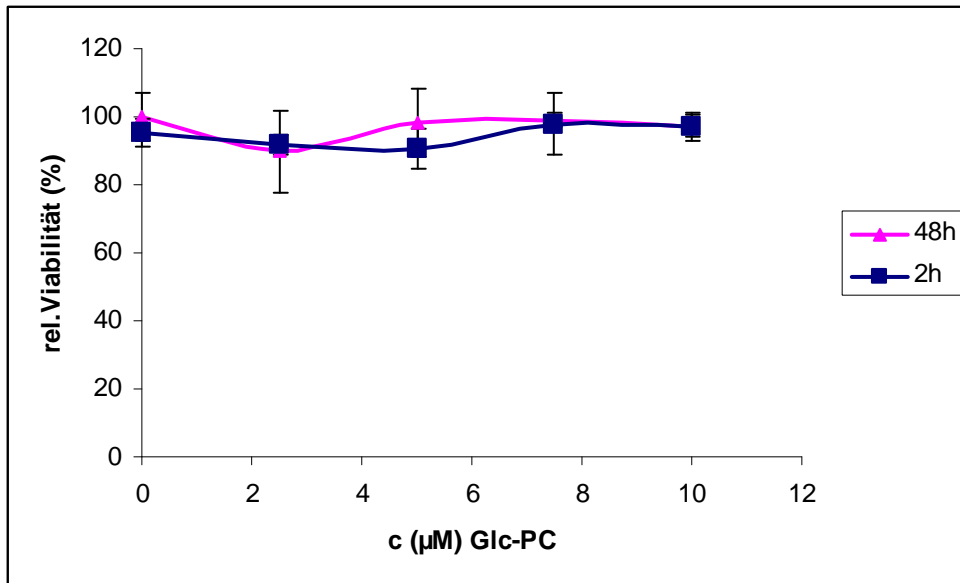


Abb. 12: Viabilität nach 2h bzw. 48h Inkubation mit Glc-PC bestimmt mittels Trypanblau. Es werden vier unabhängige Zweifach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

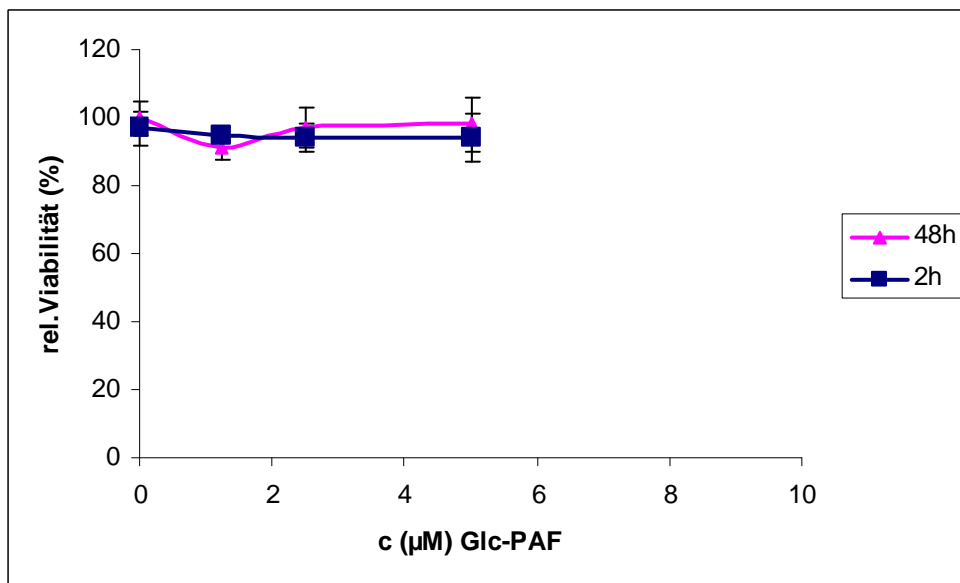


Abb. 13: Viabilität nach 2h bzw. 48h Inkubation mit Glc-PAF bestimmt mittels Trypanblau. Es werden vier unabhängige Zweifach-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.2.2. Bestimmung der Zytotoxizität durch Messung der Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase im Kulturüberstand

Die Messung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium, wird als weitere, sensitivere Methode zur Bestimmung der Viabilität eingesetzt. Diese Methode beruht darauf, dass die LDH von Zellen mit Membranschädigungen ins Medium freigesetzt wird. Die Konzentration des Enzyms im Medium kann dann im Folgenden bestimmt werden

und gibt Aufschluss über den Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl. 5×10^4 Zellen werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt und für je 2 h bzw. 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Glc-PC oder Glc-PAF inkubiert. Bis zu einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Glc-PC zeigte sich keine erhöhte Zytotoxizität. $20 \mu\text{M}$ Glc-PC erhöhen nach 2h Inkubation die LDH-Konzentration im Zellüberstand nicht. Dagegen liegt die Viabilität der Zellen nach 48h Inkubation mit $20 \mu\text{M}$ Glc-PC bei 50% im Vergleich zur Kontrolle. Die LD_{50} kann nach einer 48h-Inkubation mit $17 \mu\text{M}$ bestimmt werden (Abb. 14). Mit Glc-PAF war bereits nach 2h Inkubation in Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$ ein leichter Anstieg der LDH zu beobachten. Dieser erhöhte sich bei $10 \mu\text{M}$ auf über 50% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die LD_{50} liegt somit für die 2h Inkubation bei ca. $8,8 \mu\text{M}$. Mit Zunahme der Inkubationszeit nahm auch die Toxizität deutlich zu. Nach einer Behandlung der Zellen für 48h sind bei $5 \mu\text{M}$ 70% der Zellen abgestorben. Eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Glc-PAF erhöht den Anteil der toten Zellen auf 80%. Die LD_{50} liegt für die 48h Inkubation bei $3,5 \mu\text{M}$ (Abb.15).

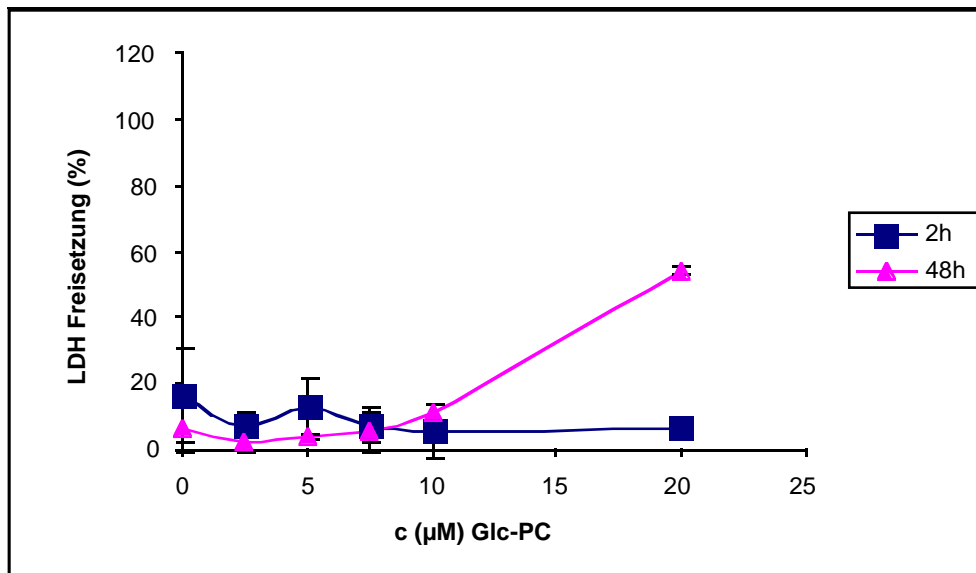


Abb. 14: Messung der Zytotoxizität mittels LDH-Aktivität nach 2h bzw. 48h Inkubation mit Glc-PC. Es werden zwei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

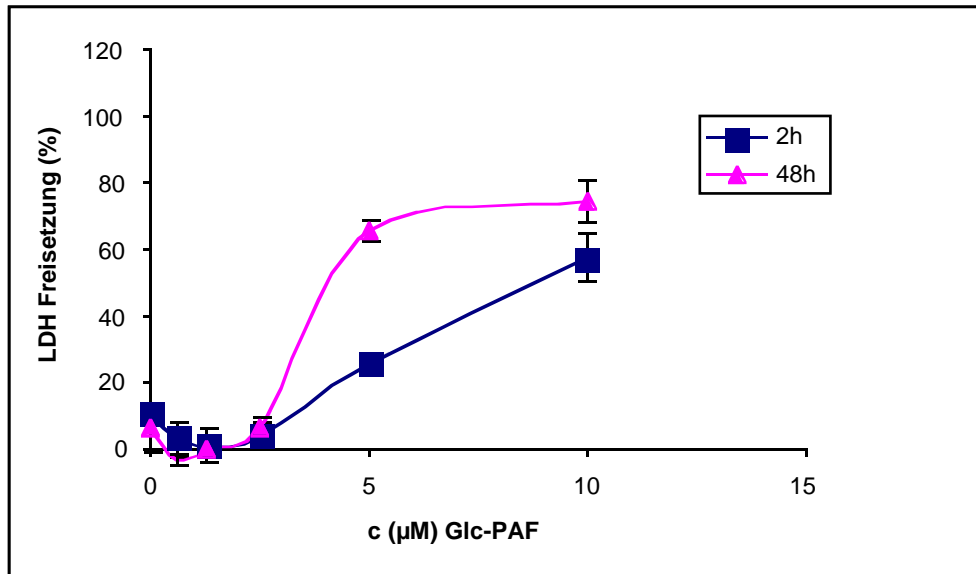


Abb. 15: Messung der Zytotoxizität mittels LDH-Aktivität nach 2h bzw. 48h Inkubation mit Glc-PAF. Es werden zwei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.3. Einfluss der glucosidierten Phospholipidanaloga auf die Morphologie der HaCaT-Zellen

Unbehandelte HaCaT-Zellen haben in Kultur die charakteristische Form epithelialer Zellen mit glattem Zellrand. Nach Zugabe von Glc-PC kommt es schon in geringen Konzentrationen zu einer Veränderung dieses Aussehens. Die Zellen werden spindelförmig und bilden Zellausläufer. Diese Veränderungen verdeutlichen sich bei höheren Konzentrationen und sind schon nach einer Inkubationszeit von 2h erkennbar. Die beschriebenen Veränderungen sind sowohl bei Adhäsion auf Plastik als auch auf den verschiedenen Matrixproteinen, wie Kollagen, Laminin und Fibronectin zu beobachten. 2,5µM Glc-PAF lösen bei HaCaT-Zellen Veränderungen in der Morphologie aus. Wie bei Glc-PC bilden sich Zellausläufer, und auch Glc-PAF induziert ein spindelförmiges Äusseres (Abb. 16).

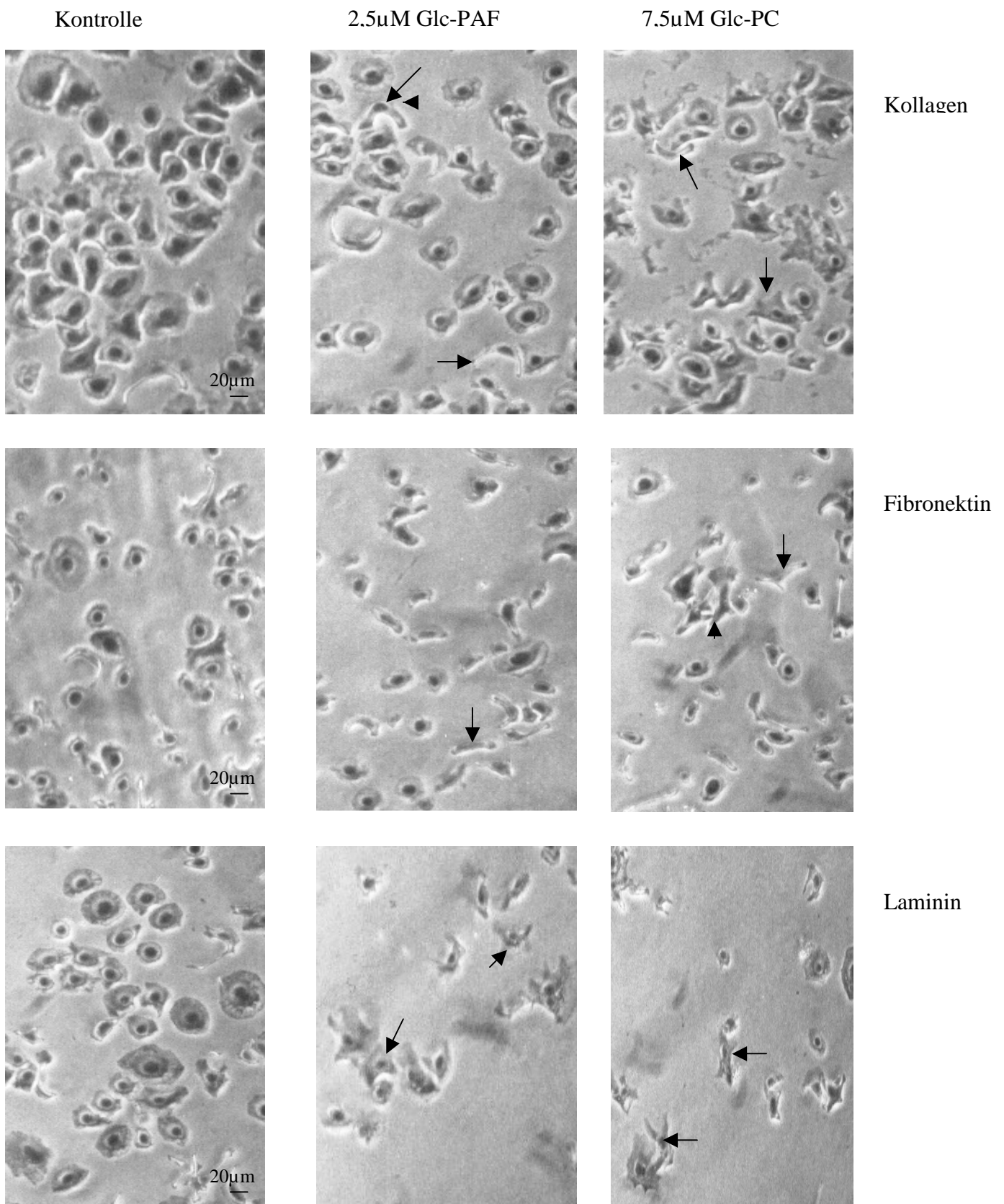


Abb.16: Veränderung der Zellmorphologie von HaCaT- Zellen nach 48h Inkubation mit 7,5 μ M Glc-PC bzw. 2,5 μ M Glc-PAF. Die Zellen werden auf den Matrixproteinen Kollagen IV, Laminin und Fibronektin ausplattiert und mit Kristallviolett angefärbt. Nach Inkubation mit Glc-PC bzw.Glc-PAF bilden HaCaT-Zellen Zellausläufer und verändern ihre Zellform. Es werden drei unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet.

3.4. Analyse des Zytoskelettes nach Behandlung mit glucosidierten Phospholipidanaloga

Die durch glucosidierte Phospholipidanaloga hervorgerufenen Morphologieänderungen der HaCaT-Zellen können durch Einfluß auf deren Zytoskelett verursacht sein. Um dies näher zu untersuchen wird mittels Rhodamin- gekoppelten Phalloidin die F-Aktin-Spannungsfasern des Zytoskelett sichtbar gemacht. Dazu werden die mit 2,5µM Glc-PAF bzw. 7,5µM Glc-PC behandelten HaCaT-Zellen auf mit Matrixproteinen beschichteten wells einer Mikrotiterplatte ausplattiert. Das Zytoskelett adhärenter Zellen wird dann angefärbt. Als Kontrolle dienen unbehandelte HaCaT-Zellen. In Abb. 17 ist das Ergebnis dieser indirekten Immunfluoreszenz dargestellt. Unbehandelte HaCaT-Zellen, die auf Kollagen IV adhäriert haben, spreiten und weisen deutlich ausgeprägte Spannungsfasern auf. Die mit 2,5µM Glc-PAF behandelten Zellen zeigen weniger Spannungsfasern im Zellinneren. Es ist viel mehr eine Verdichtung des korticalen Aktins zu beobachten. Die gleiche Beobachtung kann bei den mit 7,5µM Glc-PC behandelten Zellen gemacht werden. Zellen, die auf Fibronectin ausplattiert werden, haben unbehandelt eine sehr runde Form. Sie spreiten weniger als auf Kollagen IV und weisen kaum F-Aktin-Spannungsfasern auf. Sowohl bei den mit 2,5µM Glc-PAF als auch bei den mit 7,5µM Glc-PC behandelten Zellen kann eine punktförmige Verdichtung des F-Aktins beobachtet werden. Das Aussehen von auf Laminin adhärierten HaCaT-Zellen ist denen auf Fibronectin sehr ähnlich. Die Zellen sind rund und weisen weniger Spannungsfasern auf als auf Kollagen IV. Die mit Glc-PAF bzw. Glc-PC behandelten Zellen zeigen auch hier eine punktförmige Verdichtung des F-Aktins auf. Diese ist geringer ausgeprägt als auf Fibronectin.

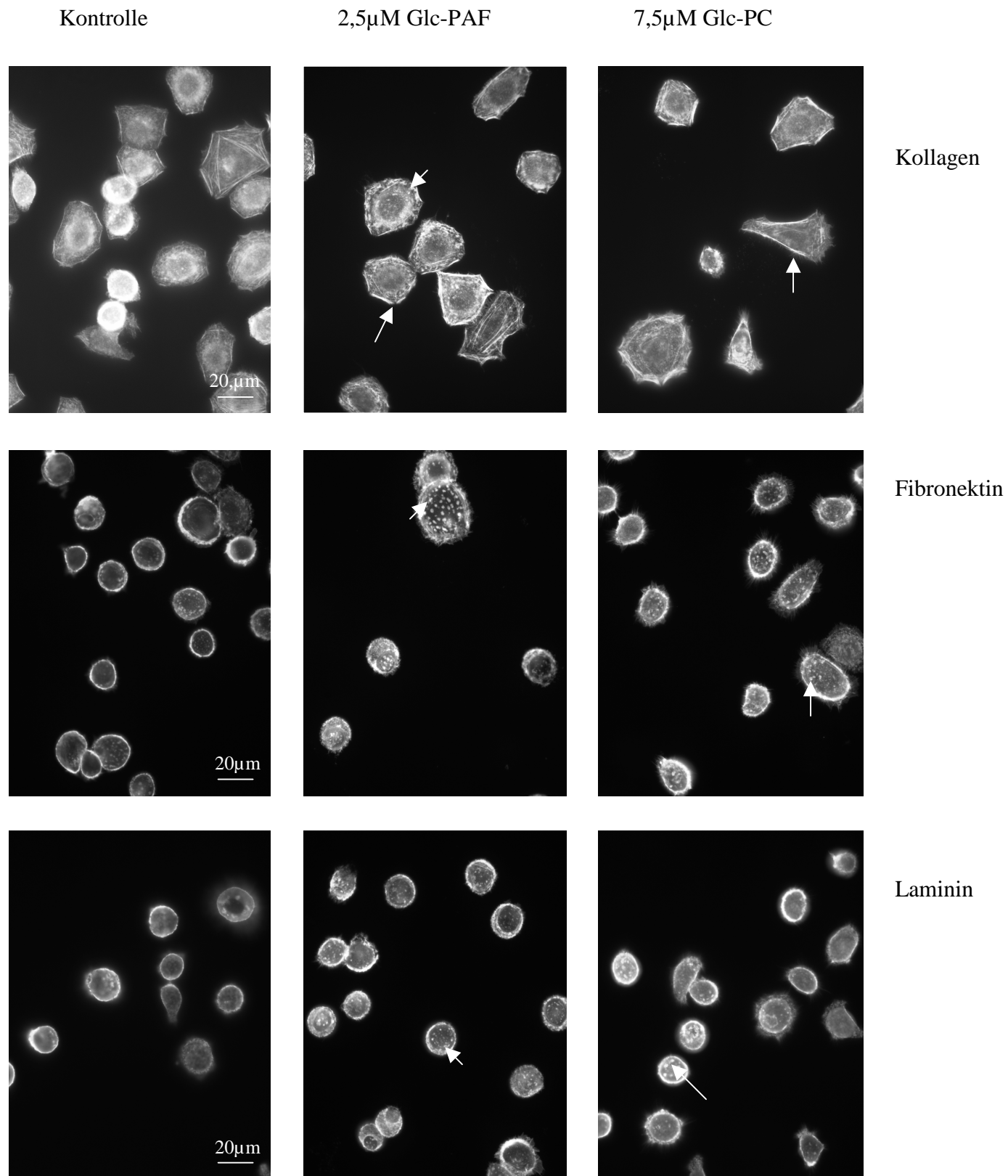


Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz mit HaCaT-Zellen auf Kollagen IV, Laminin und Fibronektin. Die Zellen wurden 2h mit 7,5 μ M Glc-PC bzw. 2,5 μ M Glc-PAF inkubiert. Anschließend auf einen mit Matrixproteinen beschichteten Objektträger ausgesät. Adhärenente Zellen werden dann fixiert und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die F-Aktin-Spannungsfasern werden mit Rhodamin-gekoppelten Phalloidin gefärbt. In der obersten Reihe sind Aufnahmen von adhärenente Zellen auf Kollagen IV abgebildet. In der mittleren Reihe adhärenente Zellen auf Fibronektin und in der untersten Reihe adhärenente Zellen auf

Laminin. Jeweils links sind unbehandelte Zellen als Kontrolle abgebildet. In der mittleren Spalte sind mit 2,5 μ M Glc-PAF behandelte Zellen gezeigt. Ganz rechts sind die Zellen mit 7,5 μ M Glc-PC behandelt. Es werden drei unabhängige Versuche durchgeführt und repräsentative Zellen ausgewertet.

3.5. Einfluss der glucosidierten Phospholipidanaloga auf die Zell-Matrix-Adhäsion

Die Morphologie der Zellen auf Matrixproteinen wird durch die Interaktion von Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen, mit der zellulären Matrix (EZM) bestimmt. Über diese Interaktion werden weiter die Zell-Matrix-Adhäsion und darüber entstandene Migrationsbewegungen von Zellen vermittelt. Wird die abhängige Adhäsion beeinflusst, kann man Rückschlüsse auf eventuell Adhäsions-vermittelte Signalwege in den Zellen ziehen, und somit Hinweise auf die Wirkweise der Phospholipide erhalten. In weiteren Untersuchungen wird das Adhäsionsverhalten auf drei verschiedenen Matrixproteinen untersucht. Dabei wird berücksichtigt, daß HaCaT-Zellen Integrin-Untereinheiten exprimieren, die für die Adhäsion auf Kollagen IV, Fibronectin und Laminin von Bedeutung sind.

Glc-PC und auch Glc-PAF werden jeweils in nicht toxischen Konzentrationen eingesetzt. HaCaT-Zellen adhäreren unbehandelt am stärksten auf Kollagen IV. Die Bindung an Laminin ist deutlich schwächer. Am schwächsten ist die Interaktion mit Fibronectin.

Sowohl nach Zugabe von Glc-PAF als auch von Glc-PC kommt es auf allen drei Matrixproteinen zu einer Zunahme der Adhäsion. Am deutlichsten wird dabei die Adhäsion auf Fibronectin erhöht. Nach 2h Inkubation mit 0,6 μ M bis 5 μ M Glc-PAF wird die Adhäsion konzentrationsabhängig auf das 6-fache des Kontrollwertes gesteigert (Abb. 18). Auf Laminin kommt es zu einer Verdreifachung und auf Kollagen IV zu einer Verdopplung der Zell-Matrix-Adhäsion. Auch Glc-PC führt zu einer Adhäsionssteigerung, die auf Fibronectin am Ausgeprägtesten ist, wie Abb. 19 verdeutlicht. Nach 24h Inkubation mit Glc-PC ist der Einfluß auf die Adhäsion weniger ausgeprägt (Abb. 20). Ein ähnlicher Effekt wird auch mit Glc-PAF beobachtet (Abb.21). Nach 48h Inkubation mit glucosidierten Phospholipidanaloga ist kein Effekt mehr auf die Zell-Matrix-Adhäsion zu beobachten. (Abb. 22 und Abb. 23).

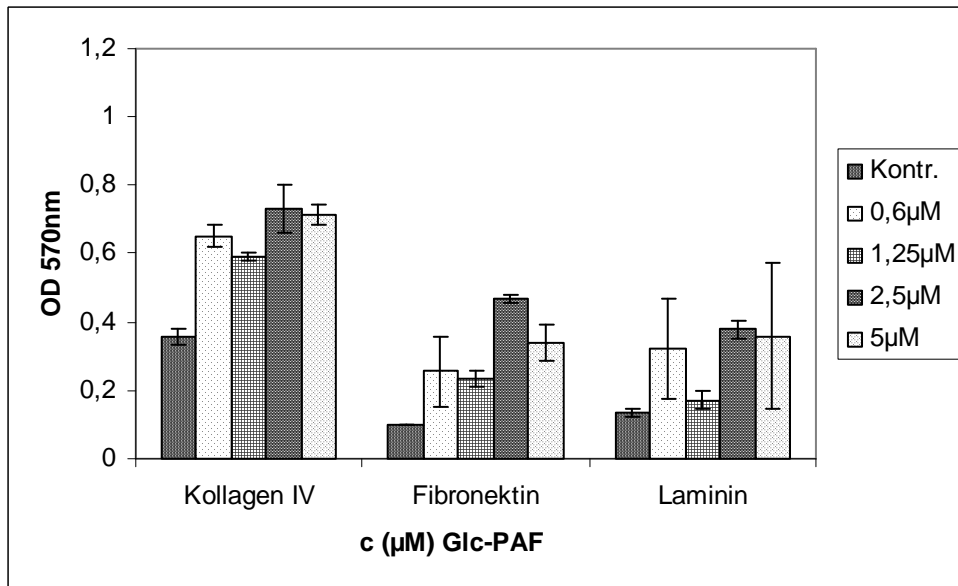


Abb. 18: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 2h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 0,6µM bis 5µM. Es werden zwei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

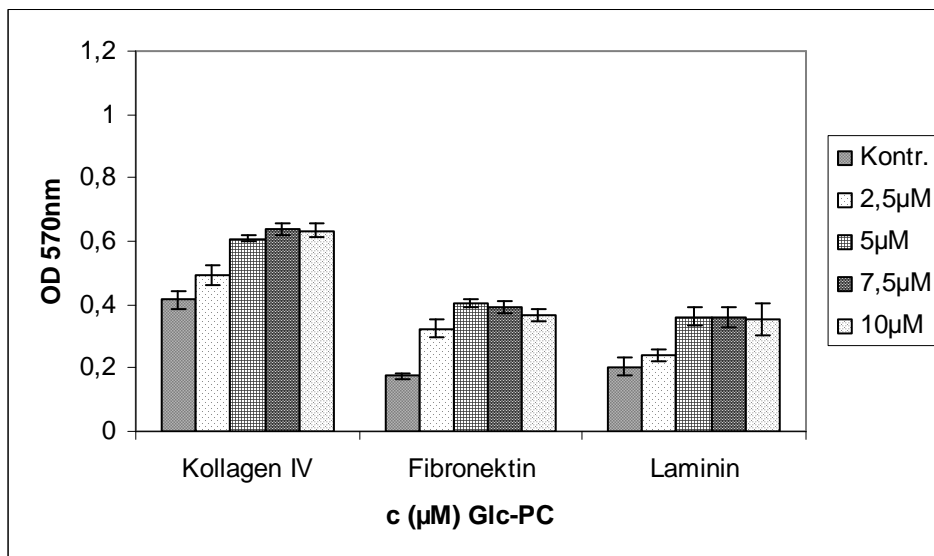


Abb. 19: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 2h Inkubation mit Glc-PC in Konzentrationen von 2,5µM bis 10µM. Es werden zwei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

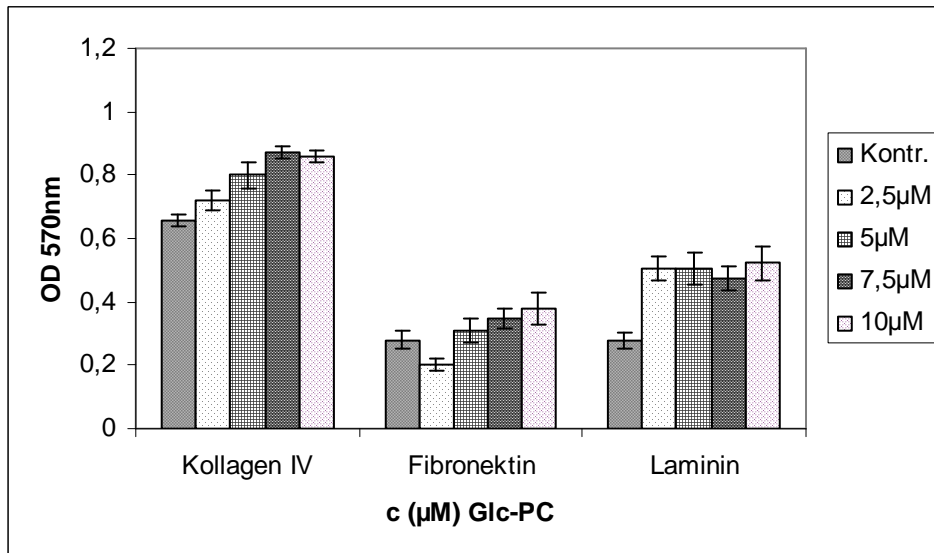


Abb. 20: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 24h Inkubation mit Glc-PC in Konzentrationen von 2,5µM bis 10µM. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

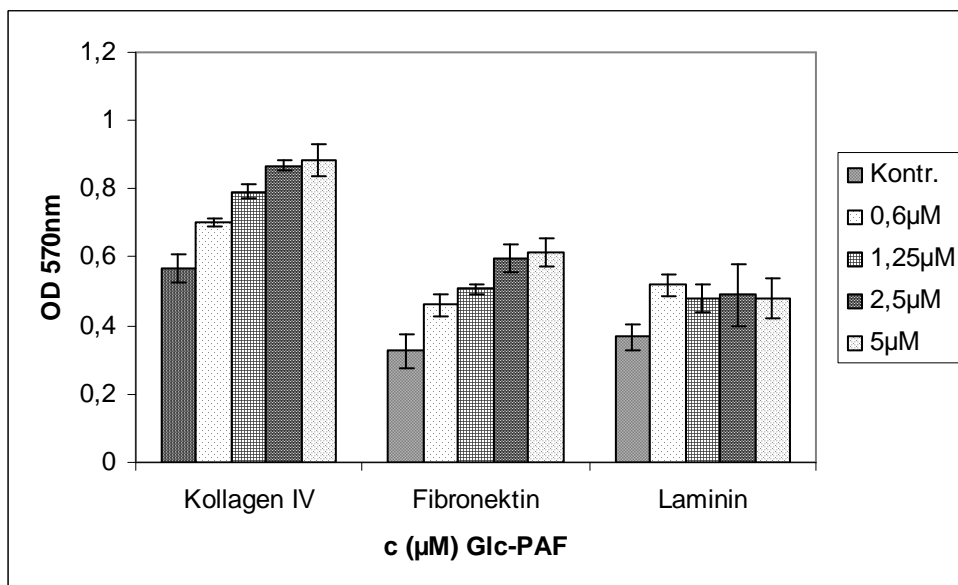


Abb. 21: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 24h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 0,6µM bis 5µM. Es werden vier unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

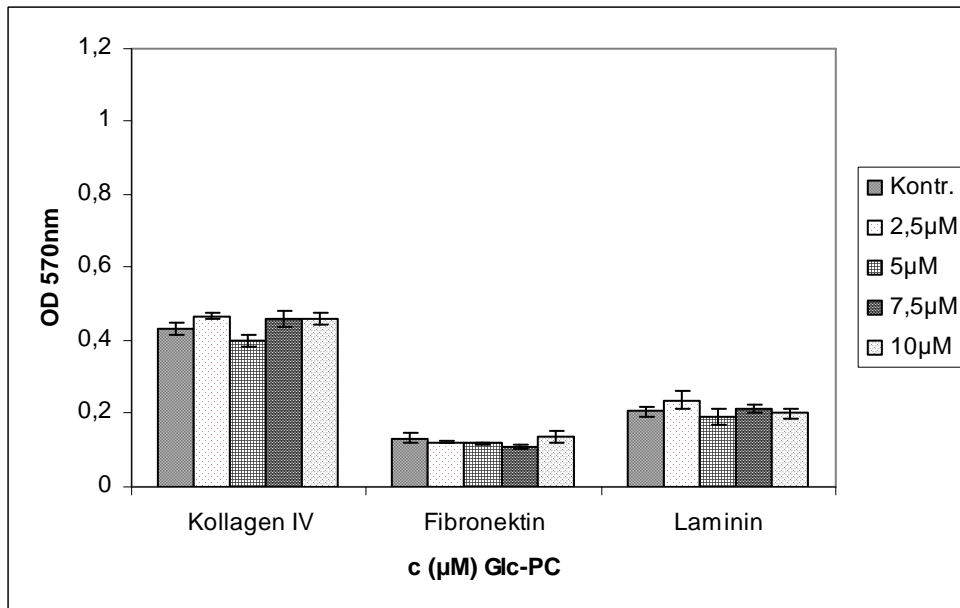


Abb. 22: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 48h Inkubation mit Glc-PC in Konzentrationen von 2,5µM bis 10µM. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

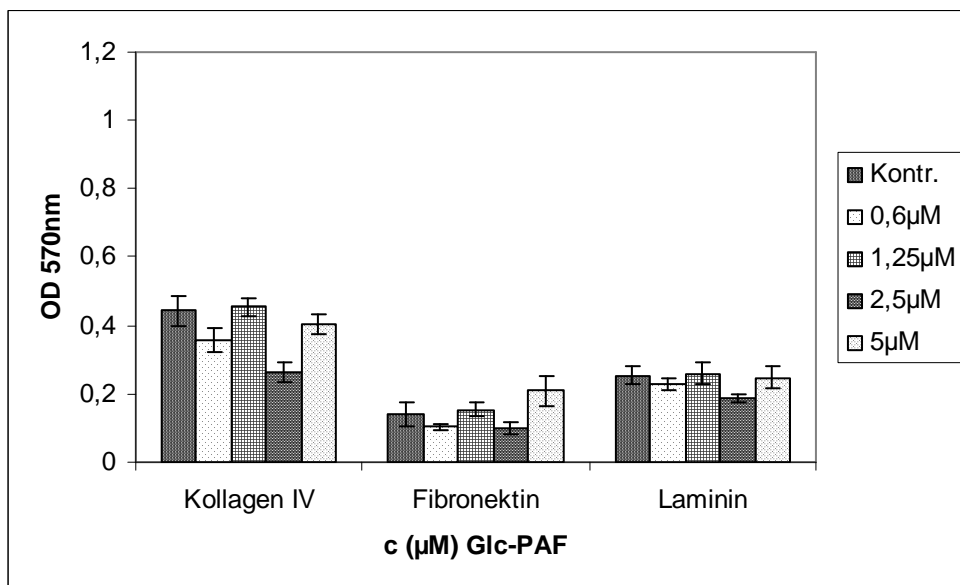


Abb. 23: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf die Matrixproteine Kollagen IV, Fibronektin und Laminin nach 48h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 0,6µM bis 5µM. Es werden fünf unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.6. Einfluss der glucosidierten Phospholipidanaloga auf die Zellmotilität

In haptotaktischen Migrationsassays soll der Einfluss der Phospholipidanaloga auf die Zellwanderung entlang eines Matrixgradienten untersucht werden. Die Migration findet dabei durch einen porösen Filter statt. HaCaT-Zellen sind in der Lage entlang eines Kollagen IV-Gradienten zu migrieren. Laminin oder Fibronectin induzieren in diesen Zellen keinen Migrationsreiz.

Nach 2h bzw. 24h Inkubation mit Glc-PC konnte bis zu einer Konzentration von 10 μ M kein Unterschied im Migrationsverhalten festgestellt werden. Bei 20 μ M Glc-PC kommt es nach 2h Inkubation zu einem Abfall der Migration. Nach 24h Inkubation ist dies noch deutlicher zu beobachten. Die Migration der HaCaT-Zellen ist hier im Verhältnis zur Kontrolle um mehr als die Hälfte eingeschränkt (Abb. 24 und 25).

Glc-PAF dagegen hat die Zellwanderung nicht beeinflusst. Nach 2h bzw. 24h Inkubationszeit kommt es zu keinem Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 26 und 27).

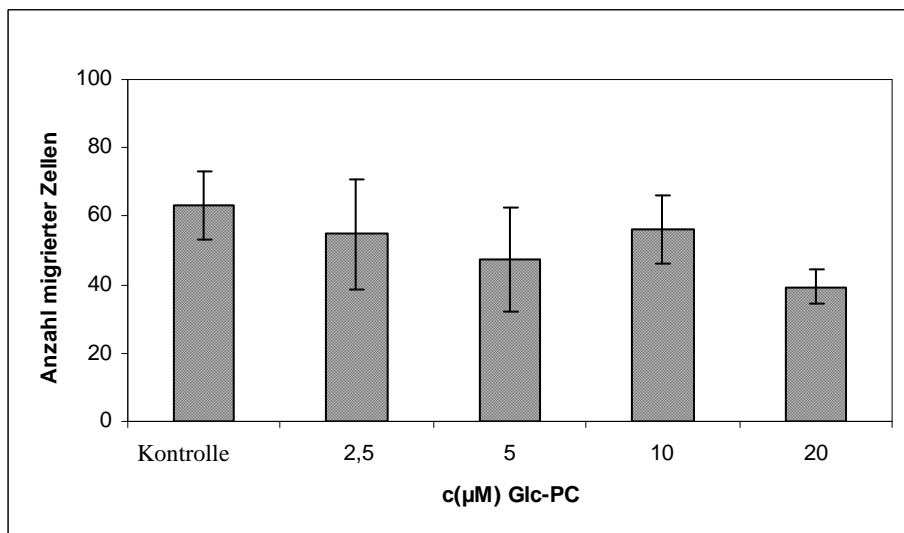


Abb. 24: Migration von HaCaT-Zellen entlang eines Kollagen IV-Gradienten nach 2h Inkubation mit Glc-PC in einem Konzentrationsbereich von 2,5 μ M bis 20 μ M. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

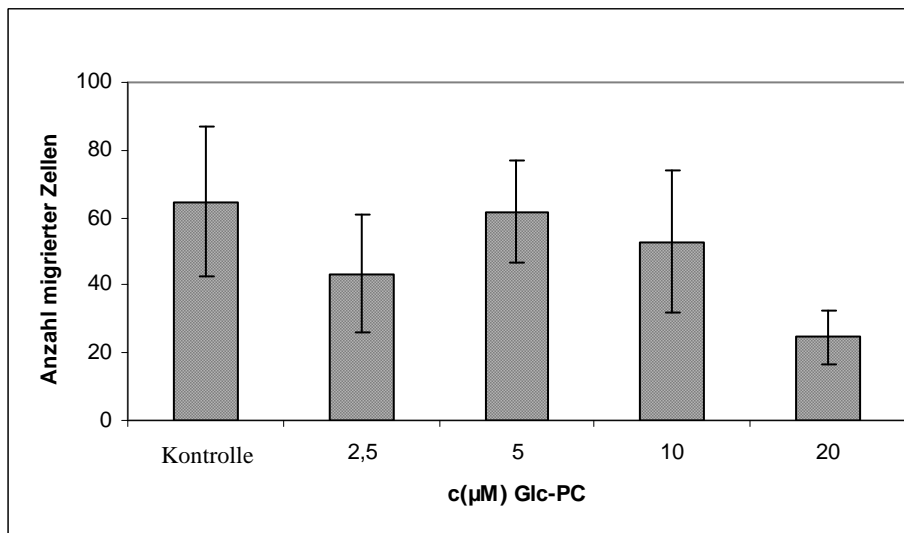


Abb. 25: Migration von HaCaT-Zellen entlang eines Kollagen IV-Gradienten nach 24h Inkubation mit Glc-PC in einem Konzentrationsbereich von 2,5μM bis 20μM. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

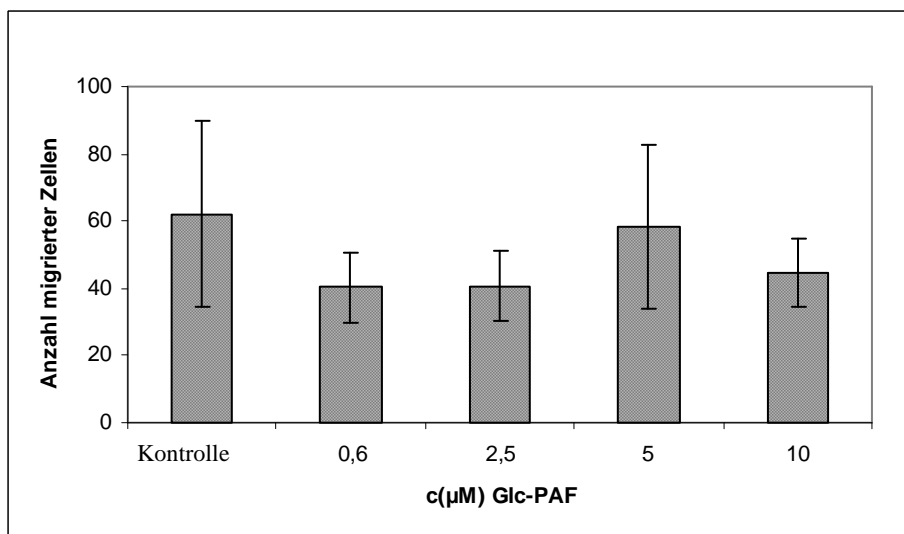


Abb. 26: Migration von HaCaT-Zellen entlang eines Kollagen IV-Gradienten nach 2h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 0,6μM bis 10μM. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

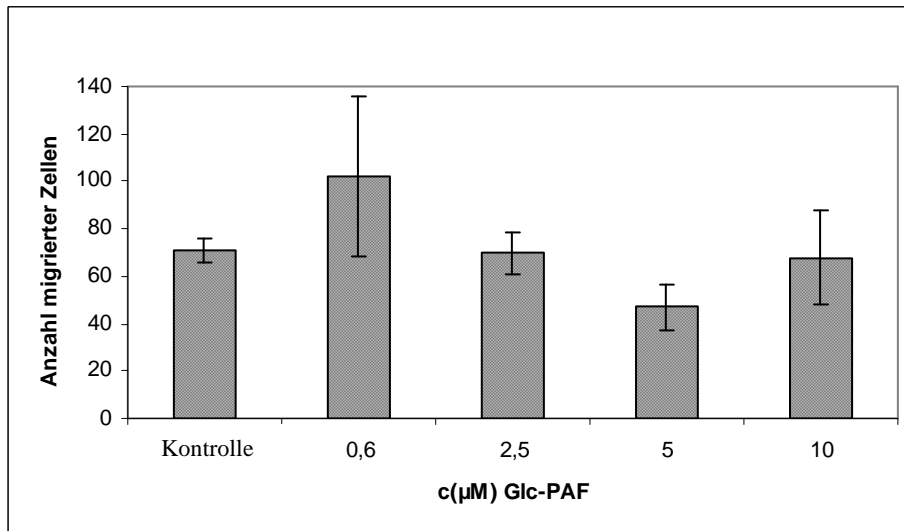


Abb. 27: Migration von HaCaT-Zellen entlang eines Kollagen IV-Gradienten nach 24 h Inkubation mit Glc-PAF in Konzentrationen von 0,6µM bis 10µM. Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.7. Untersuchungen zum Nachweis von beteiligten Signalwegen an dem Einfluss auf die Adhäsion

Die Mechanismen, die zum Anstieg der Adhäsion führen, sollen näher untersucht werden. Dabei könnte es sich um eine verstärkte Expression von Integrinen auf der Zelloberfläche handeln. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es durch die Phospholipide über einen Signalweg zu einer erhöhten Integrinbindungsaktivität kommt.

3.7.1. Bestimmung der Integrin-Expression auf HaCaT-Zellen nach Behandlung mit glucosidierten Phospholipidanaloga

Die Expression der oberflächenständigen Integrine wird mittels Fluorescence- Activated-Cell-Sorting (FACS) bestimmt. FACS-Analysen ermöglichen die simultane Messung mehrerer physikalischer Charakteristika einzelner Zellen. Dazu gehören die relative Zellgröße, Granularität bzw. interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität. Über die Bestimmung der Fluoreszenzintensität kann nach Inkubation der Zellen mit spezifischen fluorochrom markierten Antikörpern die Expression von Oberflächenantigenen analysiert werden.

Es werden die Integrin-Untereinheiten bestimmt, die von HaCaT-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert werden und an der Adhäsion auf den untersuchten Matrixproteinen beteiligt sind. Dazu gehört die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit, die Bestandteil von 12 Integrinen ist. HaCaT-Zellen exprimieren die $\beta 1$ -Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 1$, die an Fibronectin binden, sowie $\alpha 2\beta 1$, ein Rezeptor für Kollagen.

Als weitere Untereinheiten werden $\alpha 3$ sowie $\beta 4$, Bestandteil des Laminin-bindenden Integrins $\alpha 6\beta 4$, das in Hemidesmosomen lokalisiert ist, untersucht. Die Expression der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit bleibt nach Inkubation mit 5µM Glc-PC unverändert im Vergleich zu

unbehandelten Zellen. Bei den mit 20 μ M Glc-PC behandelten Zellen vermindert sich die Menge der β 1-Untereinheit auf der Zelloberfläche. Ähnliches kann für die Expression der α 3-Untereinheit beobachtet werden. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen mit 5 μ M-behandelten und unbehandelten Zellen. Bei mit 20 μ M Glc-PC behandelten Zellen kommt es zum Abfall der Expression von α 3. Für die β 4-Untereinheit kann eine geringe Stimulation der Expression in Anwesenheit von 5 μ M Glc-PC beobachtet werden. Dieses kann auch nach Behandlung mit 20 μ M Glc-PC beobachtet werden (Abb. 28). Glc-PAF beeinflusst die Expression der β 1- bzw. α 3- Integrinuntereinheiten nicht (Abb. 28).

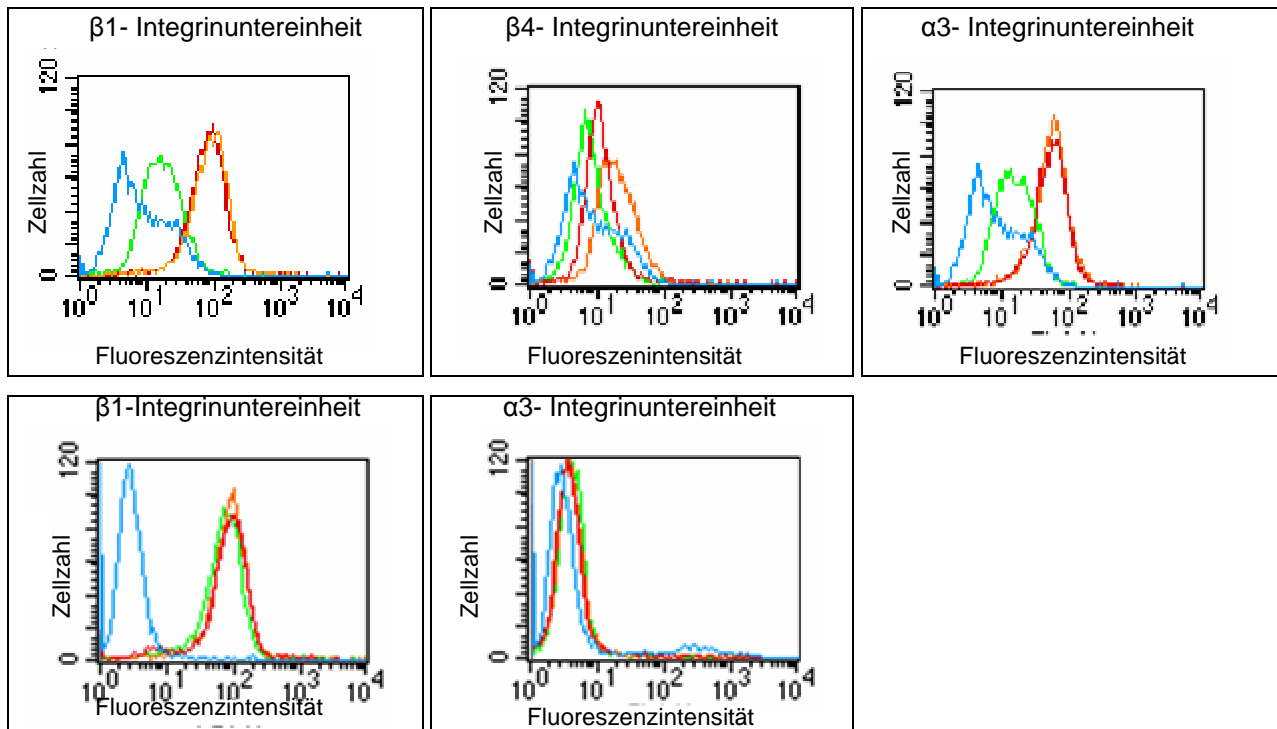


Abb. 28: FACS-Analyse der Oberflächenexpression der β 1-, β 4- und α 3-Integrinuntereinheit von HaCaT-Zellen. Die obere Reihe zeigt Analysen nach 2h Inkubation mit 5 μ M bzw. 20 μ M Glc-PC (Blau = Negativkontrolle, Rot = unbehandelte Zellen, Orange = 5 μ M Glc-PC, Grün = 20 μ M Glc-PC). Die untere Reihe zeigt Analysen nach 2h Inkubation mit 5 μ M bzw. 10 μ M Glc-PAF (Blau = Negativkontrolle, Rot = unbehandelte Zellen, Orange = 5 μ M Glc-PAF, Grün = 10 μ M Glc-PAF). Es werden drei unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils 10⁴ Zellen am FACS-Gerät ausgewertet.

3.7.2. Einfluss von U73122 auf das Adhäsionsverhalten der mit glucosidierten Phospholipiden behandelten HaCaT-Zellen

Da verstärkte Adhäsion offensichtlich nicht durch eine erhöhte Integrinexpression hervorgerufen wird, besteht die Möglichkeit, dass es über die verstärkte Aktivität von verschiedenen Signalmolekülen zu einer erhöhten Bindungsaktivität der beteiligten Integreine kommt. Hierzu wurden Adhäsionsassays in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren von Schlüsselenzymen von Signalkaskaden, die Integrin-abhängige Prozesse modulieren, durchgeführt. Gewählt wurden Inhibitoren, die die Lipid-modifizierenden Enzyme

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und Phospholipase C (PLC) hemmen, da anzunehmen ist, dass die Gabe der synthetischen Lipide die Membranzusammensetzung ändern könnte und sie somit auch einen Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme haben könnten. Die PLC reguliert die Aktivierung einiger Integrine der β 1-Familie, wodurch wiederum die Bindung an extrazelluläre Liganden wie Kollagen IV, Laminin und Fibronectin reguliert wird⁸⁵.

Ein Inhibitor der PLC ist das Aminosteroid U73122. Es wird in einer nicht-toxischer Konzentration von $1\mu\text{M}$ angewendet. Es kommt sowohl bei den unbehandelten Zellen, als auch bei den mit Glc-PC bzw. Glc-PAF behandelten Zellen gleichermaßen auf allen drei Matrixproteinen zu einer Abnahme der Adhäsion. Bei den mit Glc-PC bzw. Glc-PAF behandelten Zellen ist das Ausmaß der Adhäsion aber insgesamt auch in Anwesenheit von U73122 höher als bei unbehandelten Zellen (Abb. 29 und 30).

3.7.3. Einfluss von Wortmannin auf das Adhäsionsverhalten der mit glucosidierten Phospholipiden behandelten HaCaT-Zellen.

Als weiteren Inhibitor wurde Wortmannin eingesetzt. Wortmannin hemmt das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), welches ebenfalls an der Regulation der Integrinaffinität beteiligt ist. Eingesetzt wird der Inhibitor mit einer Konzentration von 50 nM. Wortmannin hemmt die Adhäsion unbehandelter und Glc-PC bzw. Glc-PAF behandelter Zellen. Die Adhäsion in den Analoga-behandelten Zellen ist in Anwesenheit von Wortmannin jedoch insgesamt höher als in unbehandelten Zellen (Abb. 31 und 32).

Die Tatsache, dass die Adhäsion mit Glc-PC bzw. Glc-PAF behandelter Zellen auch in Anwesenheit von U73122 und Wortmannin erhöht ist, weist daraufhin, dass die Analoga PLC- und PI3-Kinase-unabhängig wirken.

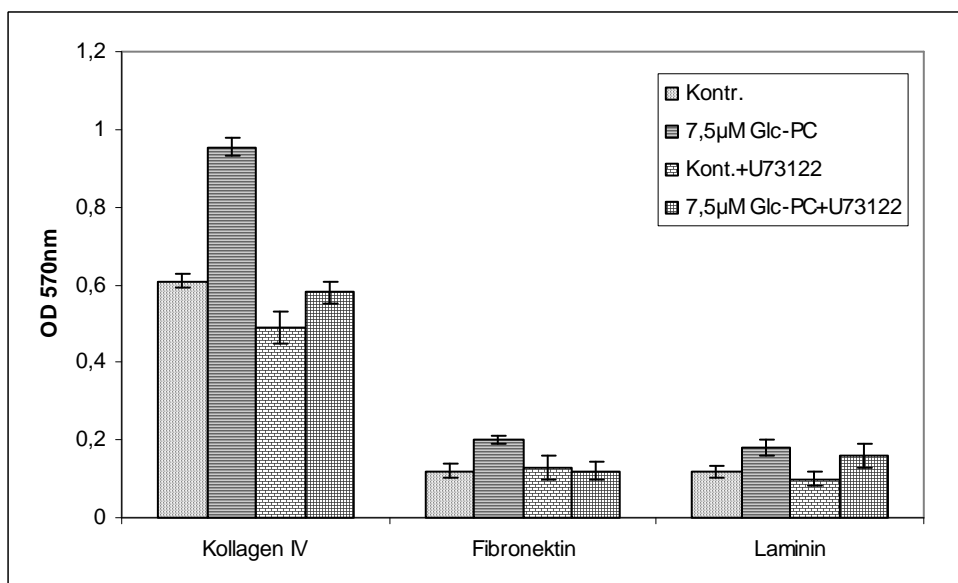


Abb. 29: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Matrixproteinen nach 2 h Inkubation mit $7,5\mu\text{M}$ Glc-PC und in Anwesenheit von U73122. Es werden fünf unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

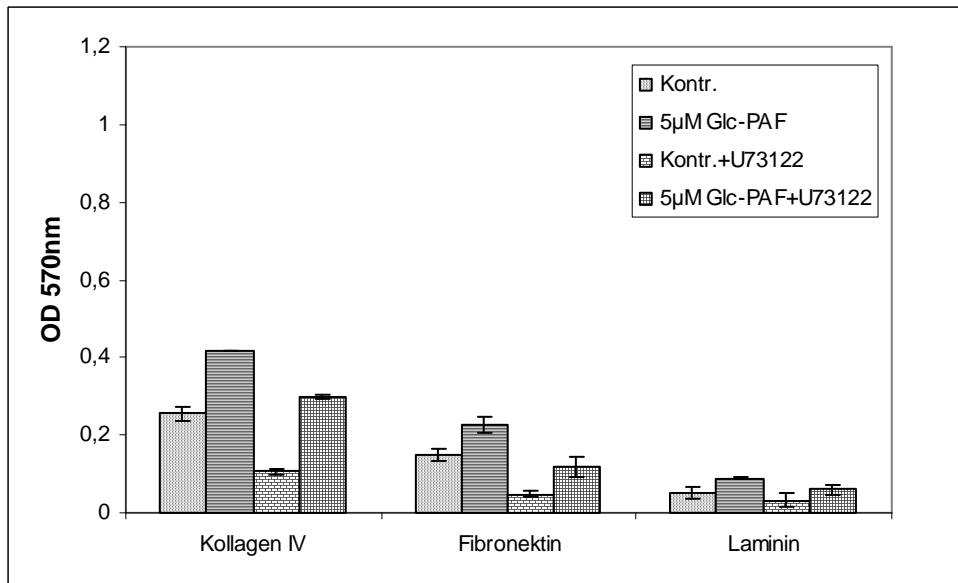


Abb. 30: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Matrix nach 2 h Inkubation mit 5µM Glc-PAF und in Anwesenheit von U73122.

Es werden drei unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

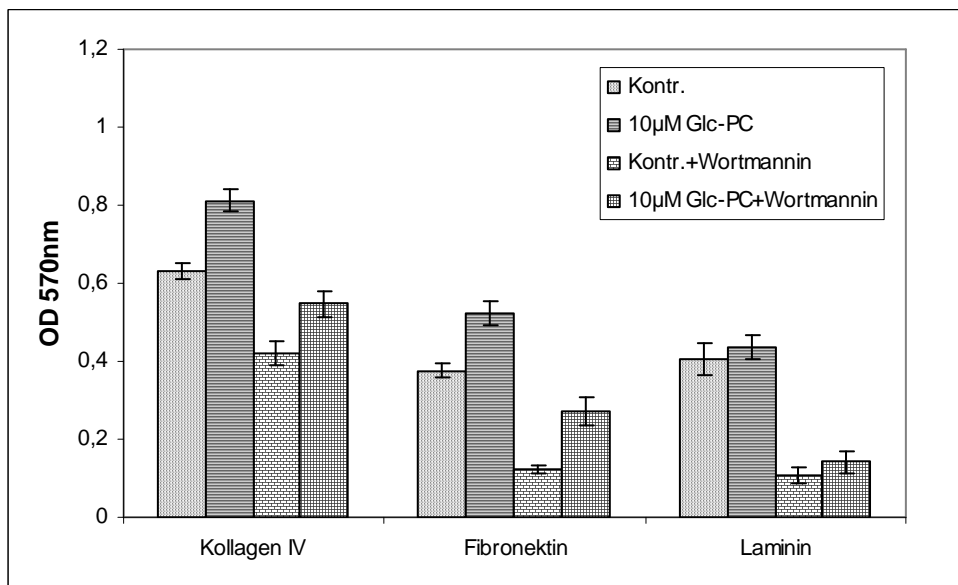


Abb. 31: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Matrixproteinen nach 2 h Inkubation mit 7,5µM Glc-PC und in Anwesenheit von Wortmannin.

Es werden vier unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

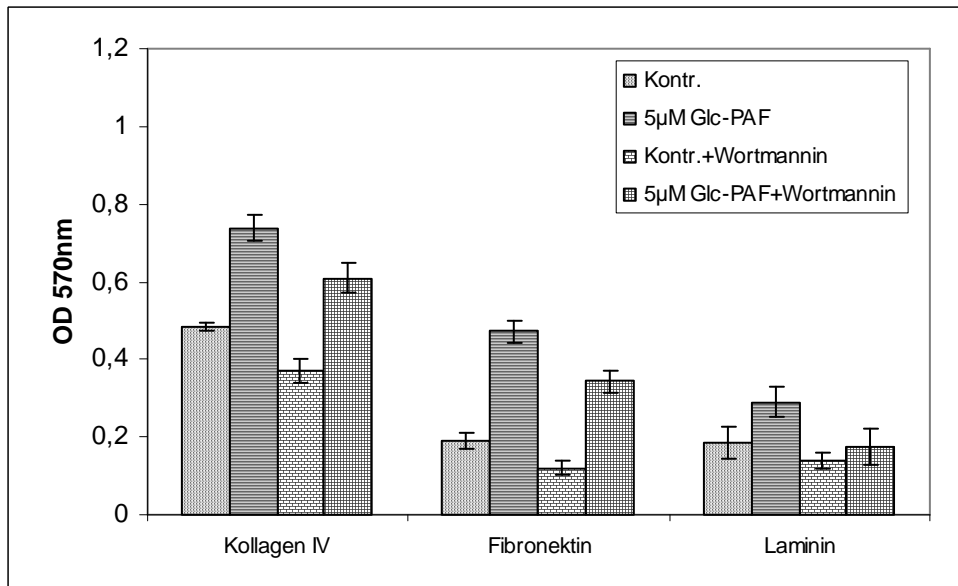


Abb. 32: Adhäsion von HaCaT-Zellen auf Matrixproteinen nach 2 h Inkubation mit 5µM Glc-PAF und in Anwesenheit von Wortmannin. Es werden vier unabhängige Vierfachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

3.8. Nachweis tyrosinphosphorylierter Proteine in HaCaT- Zellen

Tyrosin-Phosphorylierung von Zielproteinen gehört zu den ersten Ereignissen nachdem Integrine ihren Liganden gebunden haben und aktiviert werden. Die Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung durch geeignete Inhibitoren führt dementsprechend zu einer dosisabhängigen Reduktion der Adhäsion.

Die bis dahin gefundenen Ergebnisse der verstärkten Adhäsion nach zweistündiger Inkubation mit Glc-PAF und Glc-PC geben Anlass zur Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung nach Inkubation der HaCaT-Zellen mit den Phospholipidanaloga. Proteine, die nach Adhäsion von HaCaT-Zellen phosphoryliert werden, laufen im SDS-Page mit einem apparenten Molekulargewicht von 200 k, 141-148 k, 120-130 k, 110 k, 92 k, 81 k, 70 k, 54 k und 40 k.

Der Nachweis tyrosinphosphorylierter Proteine erfolgt im Western-Blot mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers PT66, der spezifisch mit phosphorylierten Tyrosinresten reagiert. Die Phosphorylierung einiger Proteine nimmt im Gegenwart von 5µM Glc-PAF zeitabhängig zu- und dann wieder ab. Deutlich wird dies nach 24h Inkubation mit 5µM Glc-PAF an einer Banden bei einem Molekulargewicht ca. 200k (Abb. 33).

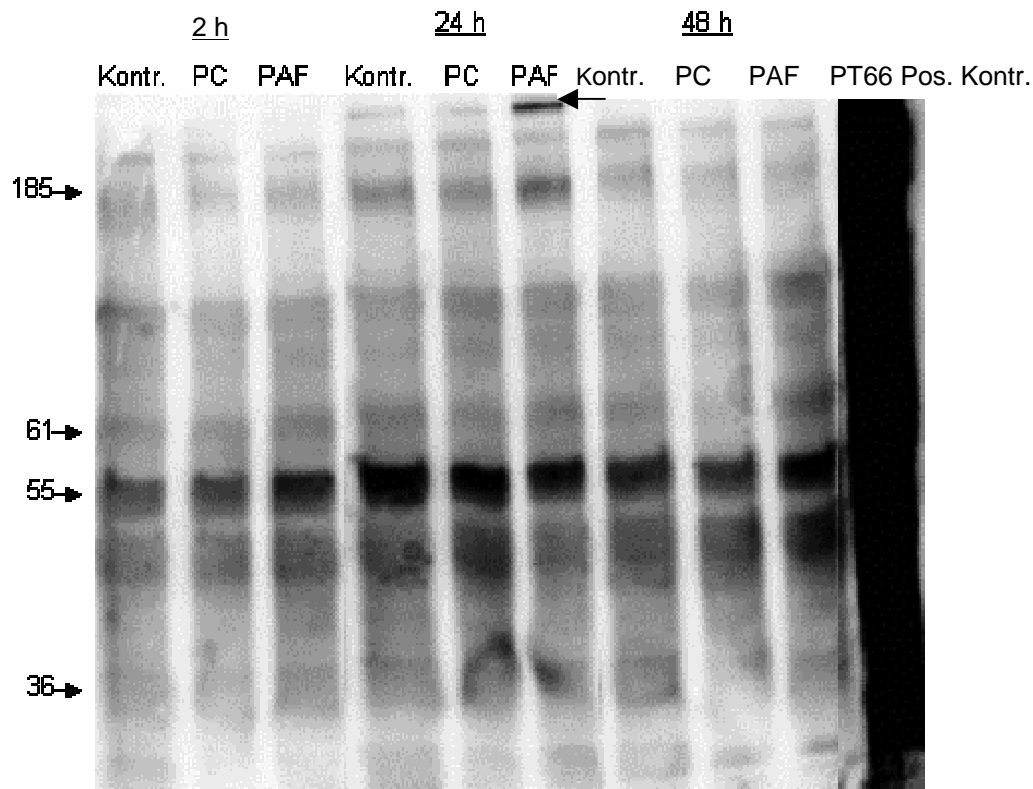


Abb.33:Western-Blot-Analyse von HaCaT-Zelllysaten zum Nachweis von Tyrosinphosphorylierungen zellulärer Proteine nach 2h, 24h und 48h Inkubation mit 10µM Glc-PC (PC) bzw. 5µM Glc-PAF (PAF). Nach der Inkubation werden die Zelllysate zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Pellets werden dann 2h auf Eis solubilisiert. 50µg Protein werden auf ein 7,5%iges SDS-Gel geladen. Nach dem Blotten wird die Nitrocellulosemembran mit dem monoklonalen Antikörper PT66, der spezifisch mit phosphorylierten Tyrosinresten reagiert, inkubiert. Nach der Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgt die Auswertung am Imager. Der Pfeil deutet auf verstärkte Tyrosinphosphorylierung nach 24h Inkubation mit 5µM Glc-PAF hin. Es werden drei unabhängige Experimente durchgeführt, gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot